

IMMUNOCYTOLOCALISATION DES PHOSPHATASES ACIDES DE *PISOLITHUS TINCTORIUS* L. LORS DE SA CONFRONTATION AVEC LE SYSTÈME RACINAIRE DE *PINUS SYLVESTRIS* (PERS.) DESV.

Violaine GOURP et Jean-Claude PARGNEY

Laboratoire de Biologie des Ligneux
Université de Nancy I, BP 239
54506 Vandœuvre-les-Nancy Cedex - France

RÉSUMÉ - La confrontation du mycélium de *Pisolithus tinctorius* (souche H 445) avec le système racinaire de *Pinus sylvestris* se caractérise par la mise en place de fibrilles polysaccharidiques unissant les surfaces fongique et racinaire. La formation de ces fibrilles est la conséquence de la reconnaissance des deux partenaires et elle correspond à la phase d'accrochage du champignon sur la plante-hôte qui conduit à la formation de mycorhizes. La localisation, par immunocytochimie, des phosphatases acides fongiques montre une bonne spécificité: des phosphatases pariétales, plasmalemma, vacuolaires et cytoplasmiques sont mises en évidence uniquement au niveau du champignon. Des phosphatases extracellulaires, sécrétées dans le milieu, sont détectées autour des hyphes; elles sont toutefois absentes dans l'espace qui sépare les hyphes de la surface racinaire.

ABSTRACT - The interface of *Pisolithus tinctorius* mycelium (strain H 445) with the *Pinus sylvestris* root system is characterized by the development of polysaccharide fibrilla which join together fungal and root surfaces. The development of such fibrilla is the result of partners' mutual recognition and corresponds to the fungus-clinging phase to the host plant, leading to mycorrhizae formation. The fungal acid phosphatase localization by immunocytochemistry demonstrates a proper specificity: parietal, plasmalemma, vacuolar and cytoplasmic phosphatases were evident only at the fungus level. Extracellular phosphatases secreted in the medium were detected around hyphae; however, they were absent in the space separating hyphae from the root surface.

MOTS CLÉS : Phosphatases acides, Immunolocalisation, *Pisolithus tinctorius*, Reconnaissance des partenaires.

INTRODUCTION

L'effet bénéfique de la symbiose mycorhizienne sur la croissance de la plante-hôte résulte en grande partie de l'amélioration de sa nutrition phosphatée (Hatch, 1937). Différentes hypothèses sont avancées pour expliquer cette amélioration (cf. Mousain, 1989). L'une d'elles envisage une sti-

mulation de l'activité fongique impliquée dans l'utilisation des formes organiques et inorganiques du phosphate rhizosphérique, par augmentation des activités phosphatasiques des symbiotes (Woolhouse, 1969). Les phosphatases acides interviendraient notamment dans les transferts entre le champignon et la plante-hôte au cours du fonctionnement biotrophique de la mycorhize (Lei, 1988).

L'existence de fortes activités phosphatasiques acides est signalée par divers auteurs tant au niveau du champignon isolé, que dans les ectomycorhizes (Barlett & Lewis, 1973; Bielecki, 1973; Ho & Zak, 1979; Calleja et al., 1980; Antibus et al., 1981). Chez les champignons ectomycorhiziens, différents types d'activités phosphatasiques acides ont été décrits: activités pariétales, cytomembranaires, solubles et excrétées (Calleja et al., 1980; Mousain & Salsac, 1982; Mousain, 1989). Leur localisation ultrastructurale a toutefois été peu recherchée; quelques études cytoenzymologiques ont été réalisées chez les mycorhizes (Dexheimer et al., 1986; Lei & Dexheimer, 1988; Lei, 1988) et sur des champignons mycorhiziens isolés (Lacaze, 1983; Lei, 1988). Elles permettent de révéler les sites d'action des phosphatases par mise en évidence de leurs activités. Toutefois, les formes inactives de ces enzymes ne peuvent être ainsi détectées. Il faut alors avoir recours à des techniques immunocytochimiques permettant la localisation précise des enzymes et non de leur activité, même si celle-ci est localement inhibée.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1 - Matériel

Après désinfection par une solution d'hypochlorite de calcium à 20 %, les graines de *Pinus sylvestris* sont mises à germer dans des boîtes de pétri sur milieu de Melin-Norkrans modifié par Marx (1969). Les jeunes plants âgés de 2 à 3 semaines sont repiqués dans de grandes boîtes de pétri renfermant le milieu de Shemanakova modifié par Chilvers et al. (1986). Dès l'apparition des racines secondaires, ils sont inoculés par des implants gélosés de *Pisolithus tinctorius* (souche H 445, isolée en Australie sous *Eucalyptus* et cultivée sur milieu de Pachlewski).

2 - Techniques de fixation et d'inclusion

Après quelques jours, les jeunes racines en contact avec les implants sont fixées pendant 16 heures à 4°C par le glutaraldéhyde à 2,5 % dans le tampon PIPES 0,1 M à pH 7, en présence de chlorure de calcium à 200 mM. Les échantillons sont ensuite lavés dans le tampon puis sont incubés à 4°C pendant 1 heure dans une solution de chlorure d'ammonium à 50 mM dans le tampon PIPES (Bienz et al., 1986). Après lavages par le tampon, ils sont déshydratés par l'éthanol à température basse (- 15°C). L'imprégnation et l'inclusion sont réalisées par la résine LR white (Newman et al., 1985; Newman, 1987). La polymérisation se fait à - 15°C sous rayonnement UV direct.

3 - Techniques de contrôle de la compatibilité des symbiontes

La compatibilité de mycorhization entre deux partenaires se manifeste précocement par la production de fibrilles polysaccharidiques dans l'espace qui les sépare (Lei, 1988). La possibilité de symbiose peut donc être contrôlée sur des coupes fines en les contrastant par le test PATAg révélant la présence, entre les symbiontes, d'un matériel d'accrochage de nature polysaccharidique (Thiéry, 1967).

4 - Techniques d'immunocytolocalisation

Les techniques de marquage utilisées sont de type indirect; elles correspondent à la détection et à la localisation d'un antigène (phosphatase acide de *Pisolithus tinctorius*) à l'aide de son anticorps purifié; ce dernier est lui-même détecté après réaction avec un second anticorps marqué à l'or.

Des anticorps polyclonaux sont préparés contre la phosphatase acide majoritaire de la fraction soluble de *Pisolithus tinctorius*, à partir d'isolats de thalles cultivés sur milieu carencé en orthophosphate (Bousquet, 1987; Bousquet et al., 1987). Le sérum obtenu un mois après la première injection présente une forte concentration d'anticorps. L'étude comparative de la réactivité des milieux de culture de différents champignons ectomycorhiziens par le test ELISA, montre que le sérum présente une haute spécificité pour *Pisolithus tinctorius* (Bousquet et al., 1987).

Immunolocalisation sur coupes semi-minces

Des coupes de 0,5 μ m d'épaisseur sont recueillies sur des lames de verre gélatinées. Afin de bloquer les sites antigéniques non spécifiques, elles sont traitées pendant 30 mn par du NGA (normal goat serum) inactivé par la chaleur et en solution à 5 % dans le tampon TBS-T-BSA. Ce tampon est préparé à partir d'une solution de BSA (bovine serum albumine) à 1 % dans le tampon TBS-T (tris buffer saline-tween).

Les coupes sont ensuite incubées dans un immunosérum "primaire" contenant l'anticorps antiphosphatase, tamponné par le tampon TBS-T-BSA et utilisé à des concentrations de 1/100 et 1/1000, à la température de 4°C, pendant une nuit. Des témoins sont réalisés en incubant les sections dans du sérum ne renfermant pas l'anticorps.

Après rinçage par le tampon TBS-T-BSA froid, les coupes sont soumises à un deuxième immunosérum dit "secondaire" couplé à des particules d'or colloïdal et dilué à la concentration 1/10 dans sa solution de TBS-T-BSA; l'incubation se fait alors à la température du laboratoire et pendant 1 heure. Les coupes sont à nouveau rincées par le tampon TBS puis par de l'eau ultra-pure.

Comme les particules d'or ne sont pas visibles en microscopie photonique, le marquage est amplifié par la formation de précipités d'argent sur les particules d'or (Janssen Chimica). Après 8 mn de traitement, les coupes sont rincées à l'eau permutee, puis colorées par la fuschine basique à 3 %.

Immunolocalisation sur coupes fines

Les coupes sont recueillies sur des grilles en or recouvertes d'un film de collodion carboné. Le blocage des sites antigéniques non spécifiques se fait comme pour les coupes semi-minces. L'incubation dans l'anticorps primaire tamponné par la solution de TBS-T-BSA est réalisée à des concentrations de 1:1000 et 1:10000, à la température de 4°C et pendant une nuit. Le témoin est réalisé en incubant les sections dans du sérum ne contenant pas les anticorps antiphosphatases.

Après rinçage par le tampon TBS-T-BSA froid, les coupes sont soumises à l'anticorps secondaire dilué à la concentration 1/10 dans la solution de TBS-T-BSA; l'incubation se fait alors à la température du laboratoire et pendant 1 heure. Après rinçage par du tampon TBS et l'eau ultra-pure, les coupes sont contrastées à l'acétate d'uranyle à 2 % pendant 10 minutes.

RESULTATS

Sept jours après l'inoculation, les racines courtes, simples ou dichotomiques du Pin sont enrobées d'un manchon mycélien assez développé. Afin d'observer les premiers contacts entre les deux partenaires, des mycorhizes plus jeunes sont prélevées (après 4-5 jours d'inoculation). Le manteau fongique est alors en cours d'installation et le réseau de Hartig est absent (Fig. 1).

Un test PATAg effectué sur une coupe fine, montre un fort marquage des parois fongiques (Fig. 2). Les hyphes éloignées de la racine, qu'elles soient isolées (Fig. 2A) ou groupées (Fig. 2B), ne montrent pas de fibrilles polysaccharidiques dans leur voisinage; seul un mucilage peu sensible au test PATAg les recouvre (Fig. 2B). Par contre, à proximité de la racine une quantité importante de fibrilles réactives sont présentes entre les hyphes (Fig. 2C) assurant ainsi leur accrochage entre elles. De nombreuses fibrilles polysaccharidiques relient également les hyphes les plus proches de la racine à la surface racinaire (Fig. 2D).

Après traitement immunocytochimique des coupes semi-minces, les particules d'argent qui visualisent les phosphatases acides de *Pisolithus tinctorius*, marquent les hyphes, mais pas la racine (Fig. 1A). Sur le témoin traité par du sérum ne renfermant pas d'anticorps, le champignon et la racine ne sont pas marqués (Fig. 1B).

Après traitement immunocytochimique des coupes fines, les particules d'or qui visualisent les phosphatases acides, sont localisées au niveau des hyphes éloignées (Fig. 3A) et proches de la racine (Fig. 3B). Le marquage est présent dans les parois, le long du plasmalemme et dans le cytoplasme notamment à l'intérieur des zones vacuolaires. La fixation et l'inclusion utilisées ne permettent toutefois pas une identification très précise des organites et, à l'exception des vacuoles, le cytoplasme est dense; des surcharges pondérales peuvent parfois apparaître et correspondre à des ultrastructures riches en phosphatases (formations plasmalemmeiques, lysosomes, par exemple). Des particules d'or sont également détectées à

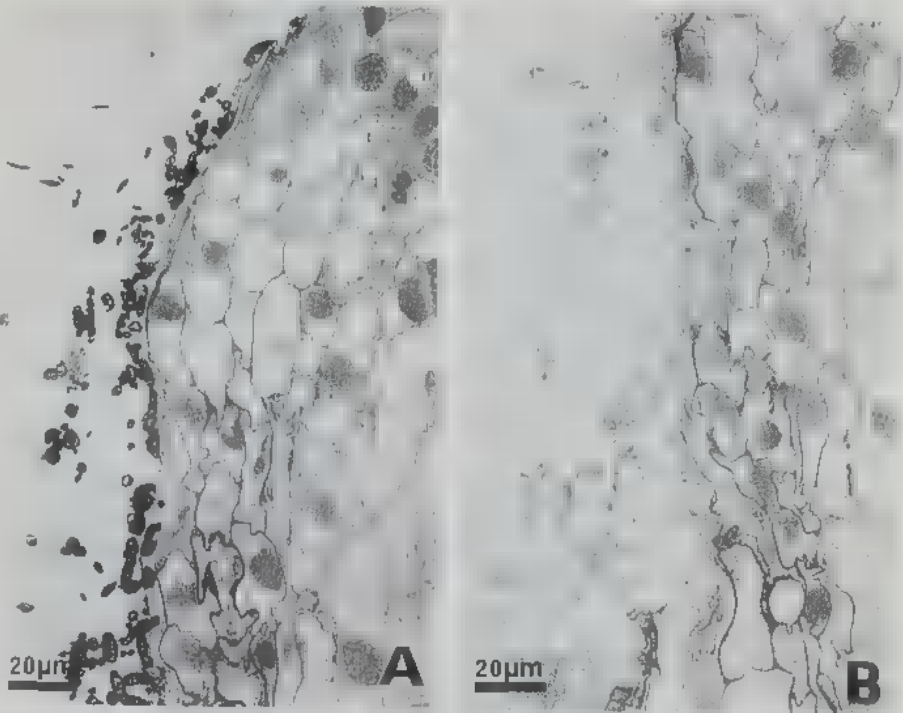


Fig. 1 - Coupe longitudinale semi-fine de racines de *Pinus sylvestris* en présence d'hyphes de *Pisolithus tinctorius*. A- Immunolocalisation des phosphatases acides fongiques. La racine n'est pas marquée. B- Préparation témoin. Les hyphes et la racine ne sont pas marquées.

Fig. 1 - Semi-fine longitudinal section of *Pinus sylvestris* root colonised by *Pisolithus tinctorius*. A- Immunolocalization of fungal acid phosphatases. The root is not reactive. B- Control showing absence of reaction on the fungal cell.

l'extérieur des hyphes, dans leur voisinage immédiat, au niveau des zones granuleuses ou non (Fig. 3B). Elles visualisent les phosphatases excrétées vers l'extérieur de la mycorhize. Dans l'espace plus ou moins important qui sépare les hyphes de la surface racinaire, les particules d'or sont absentes (Fig. 3B). La racine ne présente également aucun marquage. Sur les sections témoins incubées dans le sérum dépourvu d'anticorps, il n'y a pas de marquage (Fig. 3C).

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Les modalités d'approche du champignon vers la plante-hôte, qui se traduisent au niveau ultrastructural par la production de fibrilles polysaccharidiques entre les deux symbiotes, présentent des similitudes avec les observations effectuées par Lei (1988) de la même souche fongique en présence d'*Eucalyptus uruphylla*. Toutefois, d'autres souches de la même espèce (H 270, par exemple) ne produisent pas avec l'*Eucalyptus* la même

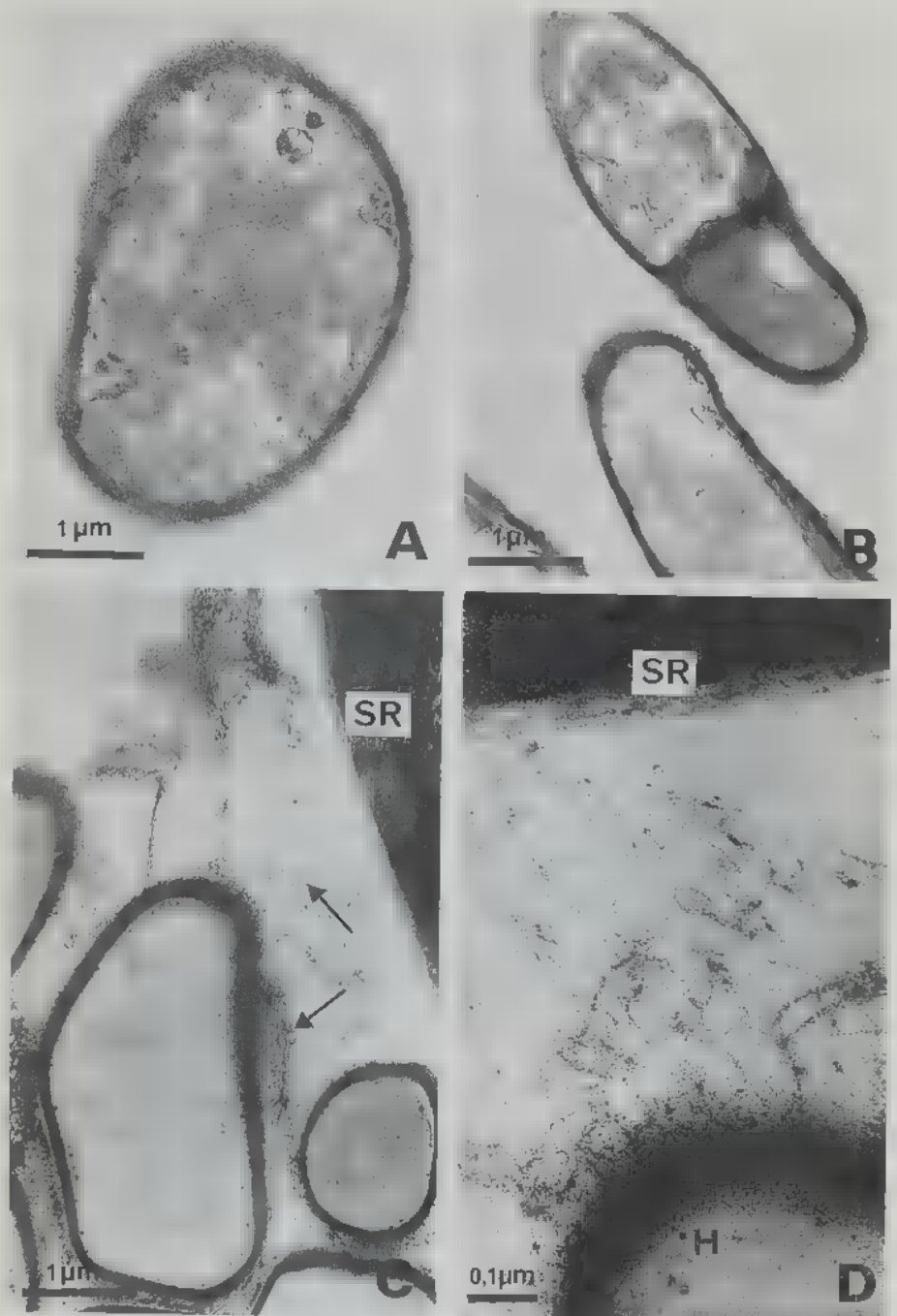


Fig. 2 - Coupes fines de l'association marquées par le test PATAG. A- Hyphe isolée, éloignée de la racine. B- Hyphes groupées, éloignées de la racine. C- Hyphes proches de la surface racinaire (SR) et fibrilles polysaccharidiques (flèches). D- Détail des fibrilles reliant les hyphes (H) à la surface racinaire (SR).

Fig. 2 - Fine sections of the association stained by PATAG test. A- Isolated hypha. B- Grouped hyphae far from the root. C- Hyphae close to the root surface (SR) and polysaccharid fibrils (arrows). D- Detail of the fibrils which span between hyphae (H) and the root surface (SR).

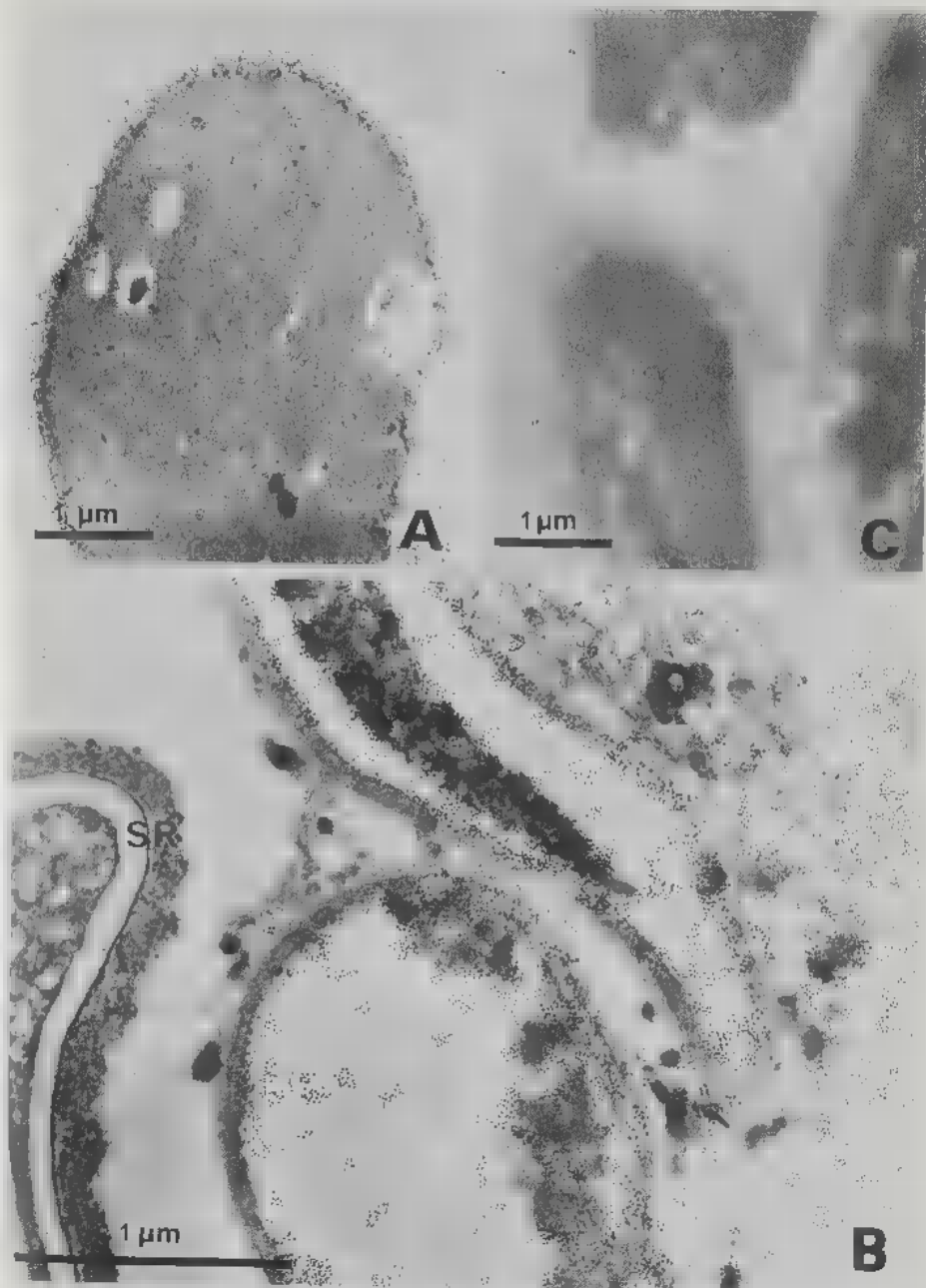


Fig. 3 - Immunolocalisation sur coupes fines des phosphatases acides fongiques. A- Hyphe éloignée de la racine. B- Hyphes proches de la surface racinaire (SR). C- Traitement témoin.

Fig. 3 - Immunolocalization of fungal acid phosphatases on fine sections. A- Single hyphae not connected to root. B- Hyphae close to the root surface (SR). C- Control.

réponse: les fibrilles sont absentes entre les deux partenaires et les hyphes ne forment pas de manteau bien organisé (Lei, 1988). La production de fibrilles polysaccharidiques semble donc être en corrélation avec leur possibilité de mycorhization. Elles matérialisent la reconnaissance entre les symbiontes et leur assurent un moyen d'accrochage. Si de nombreux auteurs ont signalé que les fibrilles de la surface cellulaire jouent un rôle important dans la reconnaissance des partenaires des associations symbiotiques (Callow, 1984; Day, 1984; Gianinazzi-Pearson et al., 1986; Lei, 1988; Ba, 1990), les processus qui précèdent cet accrochage restent à préciser.

La localisation, par la technique d'immunomarquage des phosphatases acides uniquement au niveau du champignon, montre que le sérum polyclonal anti-phosphatases acides de *Pisolithus tinctorius* présente une bonne spécificité. La paroi, le plasmalemme et les vacuoles fongiques en sont essentiellement pourvus; localement, le cytoplasme en renferme également. L'immunolocalisation de phosphatases acides pariétales a également été réalisée chez un champignon endomycorhizien, *Erica hispidula* L. (Straker et al., 1989); le sérum polyclonal utilisé est préparé à partir d'une phosphatase acide trouvée dans des fractions de parois partiellement purifiées, associées à des fractions extracellulaires de ce champignon et, de ce fait, le marquage cytoplasmique est pratiquement absent.

La présence de phosphatases acides dans des hyphes isolées (Lacaze, 1983; Lei, 1988) et dans des ectomycorhizes (Dexheimer et al., 1986; Lei & Dexheimer, 1988; Lei, 1988) a déjà été montrée grâce à l'utilisation de techniques cytoenzymologiques détectant les activités de ces enzymes. Celles-ci ont été localisées le long du plasmalemme et à la surface des hyphes et des mycorhizes; elles peuvent être assimilées respectivement aux phosphatases cytomembranaires et aux phosphatases excrétées, localisées par immunocytochimie.

Les techniques cytoenzymologiques ne permettent cependant pas de révéler la présence d'activité au niveau des parois fongiques tant chez les Basidiomycètes (Lacaze, 1983; Lei, 1988) que chez les Ascomycètes (Yamamoto et al., 1969; Wakao et al., 1975; Rainina et al., 1979). Dans des ectomycorhizes, des activités phosphatasiques acides ont pu être détectées dans le ciment qui unit les hyphes mais pas dans la paroi fongique (Dexheimer et al., 1986; Lei, 1988); ces auteurs estiment cependant que l'activité ainsi localisée pourrait correspondre à des phosphatases pariétales. L'absence de localisation par voie cytoenzymologique des activités des phosphatases pariétales pourrait correspondre à une inactivation de ces enzymes lors de leur migration à travers les parois et/ou à une impossibilité de dépôts des précipités de phosphate de plomb liée à la composition chimique des parois fongiques (Lacaze, 1983; Mousain, 1989). Leur localisation par immunocytochimie confirme les résultats obtenus par Mousain (1989) qui, par l'analyse des différentes fractions cellulaires de mycélium de *Pisolithus tinctorius*, a montré qu'une carence en phosphate du milieu stimule les activités phosphatasiques totales et essentiellement l'activité pariétale.

Par immunocytochimie, des phosphatases acides excrétées sont également détectées. Lors de sa confrontation avec les racines de *Pinus*

sylvestris. *Pisolithus tinctorius* montre une excrétion polarisée et les phosphatases acides ne présentent aucune relation avec les fibrilles polysaccharidiques reliant le champignon à la surface racinaire. Dans cette espèce fongique, leur activité a été mesurée par Mousain (1989) et, comme les activités phosphatases des autres fractions cellulaires, elle est fortement augmentée par une carence du milieu en phosphate. La sécrétion de telles enzymes dans le milieu de culture a également été constatée dans d'autres micro-organismes (Patni & Aaronson, 1974; Patni et al., 1977; Nahas et al., 1982). Les phosphatases excrétées sont essentiellement de nature glycoprotéique (Mizunaga, 1979; Kruzel & Morawiecka, 1982; Schweingruber & Schweingruber, 1982); chez *Pisolithus tinctorius*, celles qui ont été isolées semblent l'être également (Berjoud, 1986). Ces enzymes, comme toute protéine, ont une origine cytoplasmique: après leur synthèse, elles quittent le cytoplasme et migrent à travers la paroi pour être sécrétées à l'extérieur de la cellule. Cependant, à l'approche du partenaire symbiotique, le transfert des phosphatases est soit polarisé, soit partiellement réprimé; les phosphatases émises du côté de la plante-hôte sont alors bloquées au cours de leur migration pariétale. Hilbert & Martin (1988) ont notamment montré que l'établissement d'une association ectomycorhizienne entraîne des modifications au niveau des profils polypeptidiques fongiques. Tout se passe comme si des molécules "messagers" excrétées par la plante-hôte parviennent à induire au niveau des hyphes l'apparition de polypeptides spécifiques, l'augmentation ou la diminution d'autres polypeptides déjà présents dans le champignon isolé. La migration pariétale des phosphatases acides peut également être affectée par modification de la structure des parois fongiques à la suite de la confrontation des deux partenaires. La présence de la plante-hôte au voisinage des hyphes peut contribuer à transformer chimiquement et localement les parois, ce qui entraînerait le blocage de certains transferts. Chez les Levures notamment, des auteurs ont montré que des modifications des conditions de cultures ont des conséquences sur la structure pariétale et, en particulier, sur la teneur et la structure des mannanes (Bonaly & Reisinger, 1971; San Blas & Cunningham, 1974a, 1974b; Touimi-Benjelloun & Bonaly, 1975).

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient Mme V. Gianinazzi-Pearson qui leur a permis d'effectuer les techniques d'immunocytochimie à la Station d'Amélioration des Plantes de l'INRA de Dijon, et M.D. Mousain du Laboratoire de Recherches sur les Symbiotes des Racines de l'INRA de Montpellier où fut préparé le sérum.

BIBLIOGRAPHIE

- ANTIBUS R.K., CROXDALE J.G., MILLER O.K. and LINKINS A.E., 1981 - Ectomycorrhizal fungi of *Salix rotundifolia*. III. Resynthesized mycorrhizal complexes and their surface phosphatase activities. *Canad. J. Bot.* 59: 2458-2465.
- BA A.M., 1990 - Contribution à l'étude de la symbiose ectomycorhizienne chez deux espèces forestières d'Afrique intertropicale: *Afzelia africana* Sm. et *Uapaca*

- guineensis* Müll. Arg. Thèse de Doctorat, Univ. Sciences et Techniques du Languedoc.
- BARLETT E.M. and LEWIS D.H., 1973 - Surface phosphatase activity of mycorrhizal roots of beech. *Soil Biol. Biochem.* 5: 249-257.
- BERJAUD C., 1986 - Effet de la carence en phosphore sur les phosphatases acides d'un champignon ectomycorhizogène *Pisolithus tinctorius*. Thèse de Doctorat, Univ. Sciences et Techniques du Languedoc.
- BIELESKI R.L., 1973 - Phosphate pools, phosphate transport and phosphate availability. *Annual Rev. Pl. Physiol.* 24: 225-252.
- BIENZ K., EGGER D. and PASANONTES L., 1986 - Electron microscopic immunocytochemistry. Silver enhancement of colloidal gold marker allows double labelling with the same primary antibody. *J. Histochem. Cytochem.* 30: 1337-1342.
- BONALY R. et REISINGER O., 1971 - Etude des modifications chimiques et ultrastructurales de la paroi de trois levures du genre *Rhodotorula* cultivées sur deux milieux différents. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.*, sér. D. 272: 2309-2312.
- BOUSQUET N., 1987 - Etude immunoenzymatique de phosphatases acides de champignons ectomycorhiziens. Thèse de Doctorat, Univ. Sciences et Techniques du Languedoc.
- BOUSQUET N., CLEYET-MAREL J.C., BERJAUD C. and MOUSAIN D., 1987 - Use of immunoenzymatic techniques for characterization of ectomycorrhizal fungi. *Bull. O.E.P.P.* 17: 306-307.
- CALLEJA M., MOUSAIN D., LECOUVREUR B. et d'AUZAC J., 1980 - Influence de la carence phosphatées sur les activités phosphatases acides de trois champignons mycorrhiziens: *Hebeloma edurum* Metrock, *Suillus granulatus* (L. et Fr.) O. Kuntze, *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker et Couch. *Physiol. Vég.* 18: 489-504.
- CALLOW J.A., 1984 - Cellular and molecular recognition between higher plants and fungal pathogens. In: H.F. LINSKENS & J. HESLOP-HARRISON, *Encyclopedia of plant physiology*. New series, vol. 17 *Cellular interactions*. Springer-Verlag: 212-237.
- CHILVERS G.A., DOUGLAS P.A. and LAPEYRIE F.F., 1986 - A paper-sandwich technique for rapide synthesis of mycorrhizas. *New Phytol.* 103: 397-402.
- DAY P.R., 1984 - Genetics of recognition systems in host-parasite interactions. In: H.F. LINSKENS & J. HESLOP-HARRISON, *Encyclopedia of plant physiology*. New series, vol. 17 *Cellular interactions*. Springer-Verlag: 134-147.
- DEXHEIMER J., AUBERT-DUFRESNE M.P., GERARD J., LE TACON F. et MOUSAIN D., 1986 - Etude de la localisation ultrastructurale des activités phosphatases acides dans deux types d'ectomycorhizes: *Pinus nigra nigricans*/*Hebeloma crustuliniforme* et *Pinus pinaster*/*Pisolithus tinctorius*. *Bull. Soc. Bot. France* 133 (*Lettres Bot.*): 343-352.
- GIANINAZZI-PEARSON V., BONFANTE-FASOLO P. and DEXHEIMER J., 1986 - Ultrastructural studies of surface interactions during adhesion and infection by ericoïd endomycorrhizal fungi. In: B. LUGTENBERG, *Recognition in microbe-plant symbiotic and pathogenic interactions*. NATO ASI series. Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag: 273-282.
- HATCH A.B., 1937 - The physical basis of mycotrophy in the genus *Pinus*. *Black Rock Forest Bull.* 6: 1-168.

- HILBERT J.L. et MARTIN F., 1988 - Modifications des profils polypeptidiques lors de l'établissement de la symbiose ectomycorhizienne. *Cryptogamie, Mycol.* 9: 221-231.
- HO I. and ZAK B., 1979 - Acid phosphatase activity of six ectomycorrhizal fungi. *Canad. J. Bot.* 57: 1203-1205.
- KRUZEL M. and MORAWIECKA B., 1982 - Acid phosphatase of potato tuber (*Solanum tuberosum* L.). Purification properties, sugar and amino acid composition. *Acta Biochem. Polon.* 29: 321-330.
- LACAZE B., 1983 - Localisation cytochimique des activités phosphatasiques acides de champignons mycorrhiziens développés sur milieu complet ou carencé en phosphate. *Canad. J. Bot.* 61: 1411-1414.
- LEI J., 1988 - Etude expérimentale des systèmes symbiotiques mycorrhiziens de quelques essences ligneuses. Application pratique à la mycorrhization de vitoplants. Thèse de Doctorat, Univ. Nancy I.
- LEI J. et DEXHEIMER J., 1988 - Etude des variations, en fonction de l'âge, de la localisation ultrastructurale des activités phosphatasiques dans deux ectomycorhizes à Basidiomycètes et dans un champignon non associé. *Phytomorphology* 38: 9-20.
- MARX D.H., 1969 - The influence of ectotropic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology* 59: 153-163.
- MIZUNAGA T., 1979 - Some properties of phosphate repressible and constitutive acid phosphatases of baker's yeast. *Agric. Biol. Chem.* 43: 1211-1218.
- MOUSAIN D. et SALSAC L., 1982 - Nutrition phosphatée et activités phosphatasiques acides des symbioses ectomycorhiziennes cultivées isolément ou en association. *Les Colloques de l'INRA* 13: 87-100.
- MOUSAIN D., 1989 - Etude de la nutrition phosphatée de symbiotes ectomycorhiziens. Thèse de Doctorat d'Etat, Univ. Sciences et Techniques du Languedoc.
- NAHAS E., TEREZII H.F. and ROSSI A., 1982 - Effect of carbon source and pH on the production and secretion of acid phosphatase (EC 3.1.3.2.) and alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1.) in *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* 182: 2017-2021.
- NEWMAN G.R., JASANI B. and WYN FORD-THOMAS D., 1985 - Immunoreagent penetration into plastic sections. *Histochemical J.* 17: 837-842.
- NEWMAN G.R., 1987 - Use and abuse of LR white. *Histochemical J.* 19: 119-120.
- PATNI N.J. and AARONSON S., 1974 - Partial characterization of the intra- and extracellular acid phosphatase of an alga, *Ochromonas danica*. *J. Gen. Microbiol.* 83: 9-20.
- PATNI N.J., FHAWALME S.W. and AARONSON S., 1977 - Extracellular phosphatases of *Chlamydomonas reinhardtii* and their regulation. *J. Bacteriol.* 130: 205-211.
- RAININA E.I., ZUBATOV A.S., BUCHNOLOW I.B. and LUZIBOV V.N., 1979 - Acytochemical study of the localization of acid phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae* at different growth phases. *Histochem. J.* 1: 299-310.
- SAN BLAS G. and CUNNINGHAM W.L., 1974a - Structure of the cell wall and exocellular mannans from the yeast *Hansenula holstii*. I. Mannans produced in phosphate-containing medium. *Biochem. Biophys. Acta* 354: 233-246.

- SAN BLAS G. and CUNNINGHAM W.L., 1974b - Structure of the cell wall and exocellular mannans from the yeast *Hansenula holstii*. II. Mannans produced in phosphate-limited medium. *Biochem. Biophys. Acta* 354: 247-253.
- SCHWEINGRUBER A.M. and SCHWEINGRUBER M.E., 1982 - Purification and identification of inactive forms of repressive and constitutive acid phosphatase in yeast. *Biochem. Biophys. Acta* 717: 203-209.
- STRAKER C.J., GIANINAZZI-PEARSON V., GIANINAZZI S., CLAYET-MAREL J.C. and BOUSQUET N., 1989 - Electrophoretic and immunological studies on acid phosphatase from a mycorrhizal fungus of *Erica hispidus* L. *New Phytol.* 111: 215-221.
- THIERY J.P., 1967 - Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J. Microscop.* 6: 987-1017.
- TOUIMI-BENJELLOUN A. et BONALY R., 1975 - Etude des parois des levures *Rhodotorula*. V. Influence des conditions de culture sur les phosphatases de *Rh. rubra*. *Biochem. Biophys. Acta* 392: 39-50.
- WAKAO N., SAKURAI Y., SHIOTA H. and TANIMURA I., 1975 - Cytochemical localization of acid and alkaline phosphatase in *Aspergillus oryzae*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 21: 233-249.
- WOOLHOUSE H.W., 1969 - Differences in the properties of the acid phosphatases of plant roots and their signification in the evolution of adaptive ecotypes. In: R.H. ROBINSON, *Ecological aspects of the mineral nutrition of plants*, Proc. 9th Symp. Brit. Ecol. Soc.: 357-380.
- YAMAMOTO S., MINODA Y. and YAMADA K., 1969 - Localization of acid phosphatase activity in mycelia of *Aspergillus terreus* at electron microscope level. *Agric. Biol. Chem.* 33: 1351-1356.